

氏 名	中 川 敬 介
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 5176 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
学 位 論 文 名	Prostaglandin E2 EP4 Agonist (ONO-4819) Accelerates BMP-Induced Osteoblastic Differentiation (Prostaglandin E2 EP4 Agonist (ONO-4819) によるBMP骨形成作用促進効果の作用機構解明)
論文審査委員	主 査 教 授 高 岡 邦 夫 副 査 教 授 木 山 博 資 副 査 教 授 中 嶋 弘 一

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 これまでにマウス *in vivo* 実験系で示したProstaglandin E2 EP4 Agonist (ONO-4819, 以下EP4A) の全身投与・局所投与によるrhBMP-2 骨形成作用促進効果の作用機序を解明すること。

【方法】 未分化間葉系細胞株ST2を用い、rhBMP-2・EP4Aを投与した後、細胞増殖・細胞分化に及ぼす影響を評価した。骨芽細胞への分化をALP活性値およびreal-time RT-PCR（プローブはOsterixおよびALP）で、細胞増殖についてはMTT assayで評価した。PKAを含めた各protein kinaseの関与を検索するため、各protein kinase inhibitorsを前投与した後、ALP活性値を測定した。

【結果】 EP4A単独投与群では有意なALP活性の上昇は認めないが、EP4AをBMPと共投与することで、BMP単独投与群より有意なALP活性値の上昇を認め、EP4 antagonistを共投与することでこの作用は完全に抑制された。また、EP4A・BMP共投与群ではreal time RT-PCRでBMP単独投与群と比較して経時的に有意なOsterix, ALPのmRNA発現亢進を認めた。細胞増殖に関してはBMP・EP4Aを投与することでの影響はなかった。このEP4AによるALP活性値の上昇はPKA inhibitorの前投与により抑制され、他のinhibitorsでは部分的抑制にとどまった。

【結論】 *in vivo* 実験系で示されたEP4AによるBMP骨形成作用の促進効果は、BMPによる未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化促進作用がEP4Aによって特異的に促進されることによるということがわかった。またその作用機序としてEP4Aにより活性化されたPKAを介した経路が関与していることがわかった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、Prostaglandin E2 EP4 agonist (ONO-4819, 以下EP4 agonist) の骨形成蛋白 (BMP) による骨形成作用に対する促進効果に関する研究である。これまでの研究により、マウス *in vivo* 実験系でEP4 agonistの全身投与・局所投与でのrhBMP-2 骨形成作用促進効果が明らかになっている。これを受けて、本研究では、*in vivo* の系を用いて、EP4の下流の細胞内シグナル伝達に関して検討することを目的とした。未分化間葉系細胞株ST2を用い、BMPの単独投与またはBMP・EP4 agonistを共投与した後、細胞増殖・細胞分化に及ぼす影響を評価した。骨芽細胞への分化誘導効果は、ALP活性値の変動と、real-time RT-PCRを用いた、ALPおよびOsterixのmRNA発現の変動で評価した。細胞内シグナル伝達に関わる各種protein kinase (PKA, p38MAPK, PI3K, PKC) の関与を検索するため、各protein kinase inhibitorsで前処理した後、BMP, EP4 agonistを投与し、ALP活性値の変動を測定した。結果は、EP4 agonist単独投与群ではコントロールと比べ有意なALP活性値の上昇は認めないが、EP4 agonistをBMPと共投与することで、BMP単独投与群より有意なALP活性値の上昇を認め、このALP

活性上昇効果は、EP4 antagonistを共投与することにより完全に抑制された。また、real time RT-PCRではBMP・EP4 agonist共投与群でBMP単独投与群と比較して有意なALP、OsterixのmRNA発現亢進を認めた。細胞増殖に関してはBMP、EP4 agonistとも投与による影響はなかった。protein kinaseの関与については、PKA inhibitorの前処理によりEP4 agonistによるALP活性増強作用は抑制され、他のprotein kinase inhibitorsでは完全な抑制はみられなかった。これらの結果から、EP4 agonistは、*in vivo*の系ではBMPによる未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化促進作用をさらに促進すること、またその作用機序としてEP4 agonistにより活性化されたPKAを介したシグナル伝達経路が主な役割を果たしていることが推察された。

本研究は、これまで*in vivo*で認められてきたProstaglandin E2 EP4 agonistのBMPによる骨形成作用に対する促進効果の*in vitro*における分子メカニズムを中心とした作用機序解明に寄与し、ひいては将来的なBMPの有効な臨床応用の促進および汎用化につながる研究であり、博士（医学）の学位を授与されるに値すると判定された。